(19) 日本国格群庁 (JP)

(12) 公開特許公報(4)

(11)特許出版公司番号 特別2000-342253

(43)公開日 平成12年12月12日(2000-12.12)

テイコー・(参考)

표

被短記中

C12N 15/09

(51) Int CL.

4B024		
¥		
15/00		
z		
1 2N		
ပ		

審査債款 未請求 請求項の数15 OL (全 16 頁)

本報題 (12)	特配平 11—158026	(11) 田間人	(71) 田賦人 000004569
			日本たばこ産業株式会社
(22) 州曜日	平成11年6月4日(1999.6.4)		東京都港区虎ノ門二丁目2番1号
		(72) 発明者	福江井 枯弘
			静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本た
			ばこ蘇業株式会社遺伝育報研究所内
		(72) 発明者	供函 硬介
			参回異像田郡姫田町東原700番地 日本た
			ばこ産業体式会社遺伝育組研究所内
		(74)代理人	(74) 代理人 100088546
			弁理士 谷川 英次郎
			最終頁に統<

(54) 【発明の名称】 植物細菌への遺伝子導入の効率を向上させる方法

(57 [新哲]

(課題) 従来のアグロバクテリウム技による遺伝予導入方法よりも高い効率で組織を付給することなく節便に選伍子導入を行うことができる。植物細胞への遺伝予導入の効率を向上させる方法を提供すること。 (解決手段) 植物細胞又は植物組織を熱処理及び違心処理することを伴う。アグロバクテリウム属細菌を介して行われる植物細胞への遺伝予導入の効率を向上させる方法を提供した。

【特許請求の範囲】

[銀本項1] 植物細胞又は植物組織を無処理及び遠心処理することを伴う、アグロバクテリウム属細菌を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる

【請求項2】 植物細胞又は植物組織を熱処理及び違心 心理した後、遺伝子導入処理を行う請求項1配銭の方 法。 [請求項3] 熱処理が33°C~80°Cの温度範囲で行 われる請求項1又は2記載の方法。

| 2017-088-741 | 7412-088-7412-88-7412-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-741 | 2018-88-

われる静水項4記載の方法。 【静水項6】 熱処理が5 秒間~2 4 時間の範囲で行われる静水項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。 【静水項7】 37℃~52℃の過度下で1分間~2 4 時間熱処理を行う静水項1及は2記載の方法。

[韓末現8] 遠心処理が100G~25万Gの遠心加 趣度の範囲で行われる韓末頃1ないし7のいずわか1項 に記載の方法。

「請求項号」 遠心処理か500G~20万の違心加減度の適用で行われる請求項 記載の方法。 「請求項10] 遠心処理が100G~15万Gの適心加速度適開で行われる請求項9記載の方法。 「請求項11] 遠心処理が100G~15万Gの適

われる請求項1ないし10のいずわか1項に配載の方法。 法。 [請求項12] 用いる植物細胞又は植物組織が嵌子相 物由来である請求項1ないし11のいずわか1項に記載3

「請求項13」 用いる植物細胞又は植物組織が単子菜 植物由来である請求項12記載の方法。

「請求項14] 用いる植物細胞又は植物組織がイネ料 植物由来である請求項13記載の方法。

「韓本項15] 用いる植物細胞又は植物組織がイキ、 トウモロコン又はシバである請求項14記載の方法。 【発明の詳細な説明】

子導入の効率を向上させる方法に関する。 【0002】

[発明の属する技術分野] 本発明は、植物細胞への遺伝

0001]

「従来の技術」アグロバクテリウムによる形質転換さ は、一般的に、効率が高い、導入される遺伝子のコピー 数が少ない、T-DWAという特定の領域を断片化させるこ となく導入できる、短期間の培養により形質転換体を得 ることができるため培養変異が少ないなど、多くの優れ た特徴を持っている。このため、さまざまな植物観で最

特開2000-342253

3

*374.2 U C

に優れた植物の形質転換方法であるが、形質転換の成合ならびに効率は、植物程、遺伝子型ならびに用いる植物 組織に依存して大きく昇なるのが現状である(PDTPADS) で 31、1998(多考文献(36))。すなわち、形質配換に成功していない植物種かあるほか。てく一部の品種の分形質を換か可能な植物性も多い。また、利用可能な相能のが限定されており大量の材料を取り扱うととができない、変数の形質無換植物を作出した上で、目的とするには、変数の形質無換植物を作出した上で、目的とするには、変数の形質無換植物を作出した上で、目的とする形質を持った系統を遺抜する必要がある。しかしながら、この目的に即し多数の形質無換体を容易に得ることができる作物の種類は、現状では一部に限定されている。したがって、このような問題点を解決することができる状态もは手法の開発が強く値まれている。

(0004]アグロハクテリウムを介する形図転換方法 自体は、植物程により供域材料や哈袋に用いる場地の相 成などを異にするものの、材料となる組織にアグロバク テリウムの壁局液を倍岐させ、共存培費の後に形質能換 細胞の菌板を行い、形質転換値物を作出するという指作 は、通常、必要に応じ液固処理を行うかぞれ以外に特別 な処理を前すことなくアグロバクテリウムの磁体が行ひ れる (foopers et al. 1986 各年文版(37), Visser 199 1(参考文版(41)), MCのmick 1991(参考文版(31)), Un deve et al. 1991(多年文版(30)), 従って、形質転換 系の改良は、プロバクテリウムの原本、ベクター権 成、结地組成、選抜マーカー遺伝子やプロモーターの 類、供は組織の種類などを中心に研究が行われてきた。 10005) これに対し、アグロバクテリウムを接種す

高く、遺伝子導入効率の向上に加え、従来困難であった を促し、吸染対象となる植物細胞を増加させることを目 的としている。しかしながら、これは従来より広く行わ 基づく処理法ではない。なお、効果の程度や汎用性は明 らかでなく、一般的な手法として用いられていないのが に変換するという考え方に益づく研究は、ほとんど行わ れていない。何らかの簡便な処理により、そのような生 理的状態に変換することができればたいへん利用価値が 植物種や遺伝子型の形質転換を可能にする顕落な効果も 期待される。これまでの植物相做への前処理に関する研 究例としては、パーティクルガン(Bidney et al., 1992 (参考文獻(6)))および超音彼(Trick H.N. et al., 1997 組織を付傷することでパクテリアの植物組織内への侵入 文献(19)))を発展させたものに過ぎず、新規な考え方に る前の植物粗糯を、遺伝子導入が生じやすい生理的状態 れているリーフディスク法(ibrsch et al., 1985(参考 [0005]これに対し、アグロバクテリウムを接種す (参考文献(40)))処理が上げられる。どちらも物理的に **\$** 8

[0006] [毎明が解決しようとする顧知]従って、本免明の目的 50 は、従来のアグロバクテリウム技による遺伝子導入方法

[0003] このように、アグロバクテリウム法は非常

も有用な形質転換の手段として広く用いられている。

現状である。

[0000]

【課題を解決するための手段】本闡発明者らは、鋭章研 究の結果、アグロバクテリウム區和資を用いた遺伝予導 入方法において、遺伝子導入に供する値物細胞又は植物 組織を熱処理及び遠心処理することにより、遺伝子導入 **効率を有意に向上させることができることを見出し本発** [0008] すなわち、本発明は、植物細胞又は植物組 着を熱処理及び遠心処理することを伴う、アグロバクテ リウム原相菌を介して行われる植物相酌への遺伝子導入 の効率を向上させる方法を提供する。

名心処理した後、保温及び通常の無力下でアグロバクテ 【発明の実施の形態】本発明の方法では、アグロバクテ を導入する植物細胞又は植物組織を熱処理及び遠心処理 することを伴う。植物細胞又は植物粗糙は、熱処理及び リウム属細菌と接触させてもよいし、熱処理及び/又は **逸心処理しながらアグロバクテリウム属価格と接触させ** てもよい。また、アグロバクテリウム原相菌と接触させ る前に熱処理及び遠心処理を行う場合、これらの処理は 同時に行ってもよいし、いずれかの処理を先に行った後 リウム属細菌を介した遺伝子導人方法において、遺伝子 にもう一方の処理を行ってもよい。

20

【0010】熱処理条件は、用いる植物の種類や熱処理 する細胞又は組織の量等に応じて適宜選択されるが、通 第、30で~80で、好ましくは33で~55で、さち る。また、熱処理の時間は、熱処理温度、用いる植物の 種類及び熱処理する細胞又は組織の種類等に応じて適宜 お、紙処理時間は、紙の理道度が描い場合には短くても Zがましくは3.7.C~5.2 で程度の過度範囲で行われ 遊択されるが、通常5秒間~24時間程度である。な

場合には、数十時間の熱処阻により遺伝子導入効率を有 **煮に向上させることができる。特に好ましい熱処理条件** 風条件は、ルーチンな実験により容易に数定することが できる。なね、植物細胞又は植物組織を55℃以上の温 ジを受け、形質転換効率が低下する場合があるので、熱 遺伝子導人効率を有意に向上させることができる。例え は、熱処理温度が60、Cの場合には5秒間程度の熱処理 時間でも遺伝子導入効率を有意に向上させることができ 5場合がある。一方、熱処理温度が3 4 C程度の低温の は、37℃~52℃で1分間~24時回程度の場合が多 いが、その衝物相助又は植物組織にとっての過切な熱処 **食た段時間にわたった乾め困すると、植物価粒がソメー**

し、例えば3分間以下、好ましくは1分間以下程度に数 定して植物細胞がダメージを受けないようにすることが 処理温度か5.5 C以上の場合には、熱処理時間を短く

じて適宜選択されるが、通常、100G~25万G、好 ましくは500G~20万G、さちに好ましくは100 た、遠心処理の時間は、遠心加速度及び用いる植物の種 とが好ましい。なお、遠心時間の上限は特にないが、通 お、遠心処理時間は、遠心加速度が大きい場合には極め に向上させることができる。一方、遠心加速度が小さい 場合には、遠心処理を長く行うことにより遺伝子導入効 率を有意に向上させることができる。特に好ましい遠心 その植物細胞又は植物組織にとっての適切な遠心処理条 領等に応じて適宜遵択されるが、通常1秒間以上行うと て短い時間、例えば1秒以下でも遺伝子導入効率を有意 処理条件は、500G~20万G、特には1000G~ [0011] 遠心処理条件は、用いる植物の種類等に応 件は、ルーチンな実験により容易に設定することができ 常、10分間程度で目的を達成することができる。な 150000Gで1秒間~2時間程度の場合が多いが、 0G~15万G程度の遠心加速度範囲で行われる。ま

【0012】本発明の方法は、アグロバクテリウム関細 遠心処理したものを用いる、又は熱処理、遠心処理を行 特徴とするものであり、アグロバクテリウム展価値を用 いた遺伝子導入あるいは形質転換方法自体としては、周 協と接触させる植物細胞又は植物組織として熱処理及び いながらアグロバクテリウム属価値と接触させることを 如の方法をそのまま適用することができる。

の遺伝子導入あるいは形質転換方法自体は、この分野に 【0013】アグロバクテリウム国知菌を用いた植物へ おいて周知であり、広く用いられている。

ium tumefaciens) が多くの双子薬植物に根頭筋腫病 (c 物ゲノムに組み込まれることが発見された。その後この アグロバクテリウム関袖弦であるAgrobacterium rhizog [0014] 土壌細菌アグロパクテリウム (Agrobacter ンとオーキシン)の合成に関与する遺伝子が存在し、細 協遺伝子でありながら植物中で発現することが明らかに 子群が必要であり、またT-DNaが切り出されるためにはT -LNAの両端に存在するボーダー配列が必要である。他の onesもRiブラスミドによる同様なシステムを有している れており、1970年代には、11プラスミドが病原性に関与 ミド上のヴィルレンス領域(vir倒域)に存在する遺伝 rown call disease) を引き起こすことは古くから知ら すること、さらKTiブラスミドの一部であるT-DNVが植 I-DWA/Cは癌腫の誘発に必要なホルモン(サイトカイニ された。T-DNAの切り出しと植物への伝達にはバブラス (図3及び図4)。

ることが期待された。しかしながら、Tiブラスミドは19 圧子を仰入するとこの遺伝子も植物ゲノムに組み込まれ (0015] アグロバクテリウムの既禁によってT-DM が植物ゲノムに組み込まれるので、T-DNA上に所望の選 oxb以上と巨大であるため、標準的な遺伝子工学手法で はプラスミド上のT-DNA上に遺伝子を挿入することは困

誰であった。そのため、T-DM上に外来遺伝子を挿入す るための方法が開発された。

存取2000-342253

€

容易で所望の遺伝子の挿入が可能であり、大陽菌で複製 アーム型TiプラスミドのT-DW個域中に、三系交雑法(t 号(EP116718))。もう一つは、バイナリーベクター(b ものをいう。したがって、バイナリーベクターは、T-DN の方法が開発された。とのうちの一つは、遺伝子操作が 文献(10)); Fraley et al., 1983(参考文献(11)); Zamb ryski et al., 1983(参考文献(44)), 特開昭59-140885 ター/には、pBIN19(Bevan, 1984(参考文献(5)))、pBI121 (Jefferson, 1987(参考文傑(Z1))). pGA482(An et al., ホルモン合成遺伝子が除去されたディスアーム型の菌系 al., 1983(参考文献(44))). GV3Till5E(Fraley et al., 1985(参考文献(10)))などが作製された (図3)。 これ らを用いることにより、所望の遺伝子をアグロバクテリ 子を有するT-DNAをアグロバクテリウムに導入する2種類 ができる中間ベクターを、アグロバクテリウムのディス ために同じブラスミド上に存在する必要はないという結 果(Hoekema et al., 1983(参考文献(14)))に基ろいてい さなブラスミドに組み込んだものであり、これをディス アーム型汀ブラスミドを有するアグロバクテリウムに導 びvirdが存在し、(植物バイオテクノロジー専典(エン Oving ving ving ving及びvingの全てを含む 入して用いる。 アグロバクテリウムへのバイナリーベク ターの導人には、エレクトロポレーション法や三系交雑 **虫などの方法により行うことができる。 バイナリーベク** などがあり、これらをもとに数多くの新たなパイナリー [0016]まず、腫瘍性のTiブラスミドのT-DMがち (disarmed strains) であるLBA4404(Hoekema et al., 1983(参考文獻(14))). C58C1(pGv3850) (Zambryski et ウムのTiブラスミドのT-DNA中に、あるいは所望の遺伝 inary vector) 法とよばれるもので(図3)、T-DNAの 値物への組み込みにvir領域が必要であるが、機能する る。COVIの類類にはvire vire vire vire ペアグロバクテリウムと大脳部の両方で複製可能な小 1988(参考文献(2))、特開昭60-70080号 (EP120516)) 中間ベクター法と呼ばれる(Fraley et al., 1985(**参考** た、Ri ブシスミドのシステムにおいても、回数なベク タブライズ株式会社発行(1989)))、vir倒域とはC [0017]アグロバクテリウムA281(Watson et al., **く**クターが構築され、形質危険に用いられている。ま (9)))を介して相同組換えにより導入する方法であり、 riparental mating) (Ditta et al., 1980(参考文献 ターが構築され形質転換に用いられている。

..,1986(参考文献(17)))ねよびEIM105(ltox) et al., 19 virB及びvircを包む断片)を組み込んだ(Komari, 1990a るアグロバクテリウムに、所盟の遺伝子を組み込んだ1-えが容易な手法として利用できる(Komari et al., 1996 こシステムが阻免されている。一つはpriBo542のディス アーム型のTiブラスミドを有する箇系EHA101(Hood et a 形質転換能力の指いシステムとして確々の植物の形質転 **リーベクターツステムの一値にある。 つかつながら、L-**点で異なる。なお、スーパーパイナリーベクターを有す 数に利用されている。もう一つは、スーパーパイナリー ベクター ('super-binary' vector) (Hiei etal., 1994 (参考文联(13)); Ishida et al., 1996(参考文联(20)); もある。))を持つディスアーム型のTiブラスミドおよ Ski を 対数 でった、 少なく ちゅー しの vi を が 数 が や 少なくともvirB又はvirdを配む版片、さらに好ましくは wo95/06722号)システムである (図4)。 このシステム は、 2.仮数 (2.天、2.R、2.C、2.C、2.E及び2.C [0018] pTiBoS42を用いて、Cれまでに2つの新し 33(参考文献(16)))を用いたものであり、これらを上述 (以下、これらをぞれぞれ「vi-断片観検」ということ UT-DNを有するブラスミドからなることから、バイナ DNAを有する側のブラスミド、即ちパイナリースクター **収留的に取除いた 4 配数の断片(このうち好きしくは** (参糸文祭(24)))スーパーパイナリーベクターを用いる DNA領域を導入するには、三系交雑法を介した相同組換 (参考文献(21))。このスーバーバイナリーベクターツ のパイナリーベクターシステムに適用することにより、 Komari et al., 1999(参考文献(28))、WD94/00977号、 (22)); Komari et al., 1986(参考文献(26)))。 2

くの植物種で非常に高い形質転換効率をもたらすことが 明らかとなっている(Ifferet al., 1994(参札文獻(13)); ステムは、上述の臨ゝのベクターツステムと比べて、労 (於考文賦(25)); Li et al., 1996(從考文賦(29)); Sai Ishida et al., 1996(参考文献(20)); Komari, 1990b to et al., 1992(卷光文献(38)))。

【0019】本発明の方法においては、消まとなるアグ Agrobacterium tumefaciens (例えば上近のAgrobacter iumtumefaciens LBA4404(Hoekema et al., 1983(多考文 ロバクテリウム属細菌としては、特に限定されないが、 献(14)))およびElM101(Hoodet al., 1986(参考文献(1 ひ)) を好ましく用いることができる。 [0020]本発明の方法によれば、アグロバクテリウ に基づく遺伝子導入系であれば、特に限定されることな く有意な効果を得ることができる。したがって、上述の **子哲スクター、スイナリースクター、独成成和のスイナ** リーベクター、メーバーバイナリーベクターなどいずれ のベクターシステムに対しても用いることができ、本発 明による効果を得ることができる。これののヘクター質 を改変した異なるベクターシステムを用いた場合におい ム属細菌にもける病原性(vir)鍼域の遺伝子群の免現

の菌系より高い(Hood et al.,1987(参考文献(15)); Kom

の猫系であり、その宿主範囲は広く、形質転換効率も他 ari, 1989(参考文献(23))。この特性は、A281が有する

1975(参考文献(42)))は、強病原性 (super-virulent)

ន

l., 1984(参考文献(18)); Jin et al., 1987(参考文献

ドブラスミドのpTiBo542によるものである(Hood et a

ても同様である(例えば、アグロバクテリウム咸細菌の 節たなブラスミドの一部としてア グロバクテリウムに導 入するなど)。また、当然ではあるが本発明の方法によ Arを対し、これには、これでは、これでは、これでは、これできる。 F中に組み込む、ving級の一部または全部を包り出し 個物へ野生型のT-DNA領域の導入効率を高め、事実上感 れば、野生型のアグロバクテリウム属和宦においても、 染効率を向上することができる。

【0022】また、ブラスミドをAgrobacterium tumefa に基づいて選択することができる。大型で多数の制限部 **くは別途祖込んだカナレイシン、パロモマイシン等の薬 位を持つものは、通常のサンクローニングの手法では所** 望のDWをT-DW類域内に導入することが必ずしも容易で ないことがある。このような場合には、三系交雑法によ り、アグロバクテリウム區細菌の細胞内での相词組換え より組み込むことができ、当致ブラスミドに同時に若し **和に対する耐性を有する遺伝子等の適当な選択マーカー** 上記プラスミドのT-DNA包数中の包取財弊等位に存法に [0021]植物に導入しようとする所型の遺伝子は、 を利用することで目的のDNAを導入することができる。

従来法により行うことができ、例としては、上記した三 系交権法やエレクトロポレーション法、エレクトロイン [0023] 植物に導入しようとする遺伝子は、従来の 置されるものである。しかし、ブラスミドが環状である ため、境界偏列の数は1つでもよく、複数の遺伝子を異 なる部位に配置しようとする場合には、境界配列が3個 以上あってもよい。また、アグロバクテリウム属相函中 で、TiまたはRiブラスミド上に配置されてもよく、また は他のブラスミド上に配置されてもよい。さちには、複 cions等のアグロバクテリウム属細菌に導入する操作は 技術と回様に基本的にはT-DWの左右境界配列の間に配 ジェクション法、氏などの化学的な処理による方法な 数の種類のブラスミド上に配置されてもよい。 どが含まれる。

【0024】アグロバクテリウム属細菌を介して遺伝子 テリウム属細菌と単に接触させることにより行うことが できる。例えば、10°~10''細粒/甲1程度の抽胞 **遺度のアグロバクテリウム属細菌懸濁液を調製し、この** 懸濁液中に植物細胞又は植物組織を3~10分間程度没 資後、固体焙地上で数日間共存培費することにより行う 導入を行う方法は、植物細胞又は植物組織をアグロバク

\$

[0025] 遺伝子導入に供される細胞又は組織は、何 ずれの部位であってもよいし、カルスのような戦分化し 5限定されるものではなく、葉、根、茎、英、その他い た、植物の種類も何ら限定されないが、被子植物が好ま しく、被子値物ならば双子禁値物でも単子禁値物でもよ たものでも似分化していない胚等であってもよい。ま

8 [0028]下配英施例において具体的に示されるよう

た、従来からアグロパクテリウム法により遺伝子導入が 可能であった植物の遺伝子導入効率が向上するだけでは 本発明の方法によれば、従来のアグロバクテリウム 法に比較して、遺伝子導入の効率が有意に向上する。ま なく、従来のアグロパクテリウム法によっては遺伝予導 入することができなかった植物に対しても本発明の方法 により遺伝子導入が初めて可能になった。従って、本発 明における「遺伝子導入の効率の向上」には、従来の方 とも包含される (すなわち、従来0%であった遺伝子導 法では遺伝子導入が不可能であったものを可能にするこ 入効率を向上させたと考える)。

[0027]

説明する。もっとも、本発明は下配実施例に限定される 【樊施例】以下、本発明を実施例に基づきより具体的に ものではない。

[0028] 洪皓例1

(1) 供試組締ねよび供試留系

法により調致した。すなわち、開花後、7~12日目の 塩およびピタミン類 (On C. C. 1978(参考文献(8))、1 q/) カザミノ酸、2 mg/l 2, 4 - D))上で2週間培 として用いた。供試未熱胚は、開花後1~2週間の未熱種 培地 (Hiei et al. 1994(参考文献(13))、 (N6 の無機 ジャポニカイネの朝の光を供試品種とし、未熟胚を材料 18次亜塩素酸ナトリウムに10分間浸漬することにより 未熟胚由来カルスは、未熟胚を4g/1 Gelriteを含む2N6 子から採取し、Hiei, Y., et al. (参考文献(13))の方 消辱した後、未熟胚を取り出し供試材料とした。また、 未熱種子を顕を除去した後、70% エタノールに30秒、 養することにより得た。

【0029】アグロバクテリウムの菌系及びプラスミド ベクターとして、LBA4404(pIG1211和)(Hiei et al., 199 4(参考文献(13))), LBAA404(pNB131) (図2参照), LBA 4404(pT0K233) (Hiei et al., 1994(参考文献(13)))を [0030] pNB131の構築は、以下のように行った。pS 文献(27))を有するアグロバクテリウムLB4404体に導入 導入した後、Triparental matind法(Ditta G, 1980(多 831(Ishida Y, 1996(参考文献(20))を大脇歯圧392株に 素文献(9))により、pNEI(Komari I et al., 1996(参考 した。アグロバクテリウム内でpNELとpSB31の間の相同 組換えによりpNB131を得た。

介在するCLS遺伝子(Chta, S. et al., 1990(参考文献(3 イルス(CaM)の35Sプロモーターにより制御されるハ により傾徊されヒマのカタラーゼ遺伝子のイントロンが 【0031】pICIZihmOT-DW類域には、ノバリン合成 マイシン耐性(nptII)遺伝子、カリフラワーモザイクウ イグロマイシン耐性(hpt)遺伝子、35Sブロモーター 群案(nos)遺伝子のプロモーターにより制御されるカナ

[0032] pNB131のT-DNA領域には、35Sプロモー

ターにより制御されるbar遺伝子、35Sプロモーター により制御されイントロンが介在するQK遺伝子(上 [0033] pTOK233のT-DNA質域には、nosプロモータ により制御されるhpt遺伝子、35Sプロモーターによ り制御されイントロンが介在するQus遺伝子(上述)を 有する。pTOC33は形質転換能力が高いスーパーパイナ --により制御されるnptII遺伝子、35Sプロモーター リーベクター(Komarri, T. et al., 1999(参考文献(? 8))755.

[0034](2) 熱処型

ターバスに数秒~数十時間浸漬することにより熱処理を **供試組織5~200mgを2m1の減菌水の入ったチュー がに没漬した。チューブを各処理温度に設定したウォー** 行った。熱処理終了後、チューブは流水で治却した。

[0035](3) 強心処理

供試組織を破菌水の入った遠心用チューブに後潰し、25 C、20,000CC1分ないし50分の遠心処理を行った。

[0036](4) 接種および共存培養

セトシリンゴン、0.2 M ショ塩、0.2 M グルコース)に **基関した。また、賠債後の道密度は、約0.3~1×10°C** 熱もしくは途心処理、あるいは組合せて処理した後、チ 獻(39)))、MS微量塩類 (Murashipe, T. et al., 196 fu/mlに調整した。約5分間室温で静図した後、共存培養 現調査に供した。すなわち、共存培養処理直後、組織を 4 - クロロー3 - インドリルー B - D - グルクロン酸(X **格費したアグロバクテリウムのコロニーを白金耳でかき** とり、修正AA培地(AA主要無機塩類、AAアミノ酸 及びAAビタミン類(Toriyama K.et al., 1985(参考文 (参考文献(13))) を用いた。25C、暗黒下で3~7日間共 存培費した後、未熟胚の一部を、 Hiei5 (1994) (参考 文献(13))の方法によりx-Guc処理によるcus遺伝子の発 -glnc)および20% メタノールを含むリン財機衝液を添加 ューブ内部の破菌木を除き、アグロバクテリウムの慰潤 した。パクテリア懸褶液の調製はHiei, Y. et al.,(参 2(参考文献(32)))、1.0 g/1 カザミノ酸、100 μMア 用の培地に置床した。共存培費の培地には、84/1 アガ 0.1% Triton X-100 を合む0.1 M リン酸极衝液(pH6.8) K及近し、3.7.Cで1時間静置した。リン麒縦衝波でア グロバクテリウムを除去した後、1.0 mm 5 - ブロモー した。37℃で24時間処理した後、骨色の星色を示す 嵌を加え、5~30秒間ポルテックスミキサーにより留枠 教文獻(13))によった。すなわち、AB結婚 (Chilton, M-D., et al., 1974(参考文献(7)) 上で3~10日間 ロースを培地固化剤とした2NG-AS (Hiei et al. 1994

となった。

組織を顕微鏡下で観察した。

[0037](5) 形質転換細胞の選抜 (ジャボニカイ

共存培養後、肥大生長した未熱胚の胚盤部位をメスによ り4~7分割した後、選抜薬剤を含まない2NG倍地(上

9

時間2000-342253

2.4-Dを含みココナッツ水を除いたCO合地(Potrykus e れた異剤耐性カルスを、それぞれ同議度の退抜類剤を含 し、7日間30℃明条件下で2次選抜を行った。各培地には riteを用いた。培地上で増殖した蝦和耐性カルスに x-G 条件下で約2~3週間培費した。なお、10mg/1フォスフィ ノスリンン(PPI)を函抜版剤に含む枯粕には、 2 mg/nの t al. 1979(参考文献(34))) を用いた。 培地上に形成さ ひNG-/拾档 (Hiel et al. 1994(参考文献(113))) に移楹 ナトリウムを組み合わせ、もしくは250 mg/1セフォタキ シムを単独で添加した。また倍地固化剤には、4g/1 Gel luc処理を行い、上記の方法によりaux遺伝子の発現を調 也)で数日間30℃明条件下で培養した。次に、50~100 E/JCイグロシムツン包む5NS語筒上に移植り、30C明 250 mg/1セフォタキツムセ250 mg/ かがくリンジン

[0038](6) 結果

熱および迫心を組合せねよび単独で未禁服に処理し、LB く、より高頻度で遺伝子導入が生じていた。さらに、熱 A404(pIG121hm) もよび(BA4404(pA81.31) との共存信扱し 示した。無処理区に比べ、無処阻もしくは迫心処阻を行 と遠心処理を組み合わせることにより、その傾度がさら た後のGIS遺伝子の一通性角項の結果を表1および表2に った場合に、胚盤におけるOLS発現領域は明らかに広 2

【0038】イネ末熱胚とアグロバクテリウムを共存培 数した後、選抜類剤を含む増加上で培費して得られた形 質転換カルスの遺抜結果を表-3、表-4ねよび数-5に示し た。薬剤耐性から一様なCUS遺伝子の発現を示す形質転 換カルスが得られる効率は、いずれの試験においても、

石瓶くなった。

遠心処理を組合せて行うことにより、それぞれ単世の処 また、熱および遠心処理を組み合わせることで、それぞ れの単独処理よりもさらに形質転換効器が値上した(表 理よりもさらに高い頻度で形質転換できることが明らか 3. 数4. 数5)。以上のように、イネ末熱胚へ無ねよび 熱または遠心処理を行うことにより、関替に向上した。

独で遺伝子導入の効果が低い場合には、熱処理を併用す ることによって遺伝子導入効率が顕著に向上し、その効 らに、遠心処理時に遠心機の温度設定を40°C前後とする 【0040】また、品種の違いなどによって協心処理中 果は熱処理単独区より高知度となることも確認した。さ てとて、近心と数の同時処理が可能であり、上記の組み 合わせ処理と同様な効果があることを確認している。 \$

険が行うことができることを報告している。また、Alde は、イネのカルスを材料として比較的高い効率で形質転 mita FX et al.,(参考文献(1))は、イネの未熟配を用い **た形質転換例を報告している。 Cれるの形質転換手法を** より効率よく安定して実施するために、上述した組み合 【0041】Hiei et al. (1994) (粉粒文献(13)))

わせ処理法は非常に有効である。特に、未熱胚は栽培環

ន

8

特開2000-342253

特開2000-342253

ができるものと推察される。 [0042] 境に左右されやすく形質転換に好過な未熱胚材料を常時 **得ることは容易ではないが、組み合わせ処理を施すこと** により安定した高い形質転換効率を維持することが可能 である。Hici etal. (1994(参考文献(13))は、形質転換 ば、スーパーパイナリーベクターのLBA404(pT0/233)を 用いた試験においてのみ、形質転換体を得ている。本研 語力の指こくクターであるスーパーパイナリースクター がイネの形質転換効率を向上させることを示した。ま た. Aldemita RR. et al., 1996(参考文献(1))によれ

とができる。また、スーパーパイナリーベクターと組み 合わせ処理法を併用することにより、より一層効率を向 上させることが可能である。さらに、組み合わせ処理法 を用いることにより、これまで全く形質転換体を得るこ とができなかった品種においても形質転換体を得ること * ターに匹敵するか、それ以上の遺伝子導人効率を得るこ

【表1】妻1 熱・遠心処理と未熱胚胚盤におけるQS遺

おいても、スーパーパイナリーベク*	-11-16	7	アール	*		;			1	
免理出度	は祖之州		藝	未绝级	ぎ					
(約20年1月10)	(ALMPHAND)		米路路	H	夏	胚盤が面における GLB 発現事域の割合 (%)	B発現	砂粒の	31B (9	(9
			赵	0	£	1-10	Ť	-J&	\$	80 -1 00
							20	S	89	
			8	3	60	8	1	0	0	0
46°C (5.9)			8	1	6	7	•	7	0	0
	20, 2000 (30	Я	8	0	ı	•	7		-	0
	(£	-								
46°C (5.9)	20,0000 (30	g	æ	0	0	0	2	8	8	1
	(/)									

※ [表2] 表2 熱・遠心処理と未熟胚胚盤におけるのS週 伝子の一道性発現(品種:朝の光) × 供试菌系:LBA440A(pIGL211m),共存培资期間:5日

约型温度	は心が強度	¥	林縣縣	Ø		ı			İ
(包型中国)	Contraction	未築紙 <u>距離表面における GLB 発現物域の割合(%)</u>	H-MC	圓	317.5 G	SA型	KOKO	会	3
		凝	0	Ī	1-10	Ť	ģ	윰	80-100
						æ	8	8	
		8	-	22	4	_0	_0		0
46°C (5.9)		8	0	0	5				0
	20,0000 (30	8	0	۰	6		•		
	€								
46°C (5.9))	20,0000 (30 20	8	•	•		60	7	•	0
	(

供試菌系:LBA4404(pNB131),共存培養期間:6日 [0044]

【表3】表3 未熟胚への熱・遠心処理と形質転換カル スの選抜効率 (品種:朝の光)

供買未完 市部社 018 路 874 (%) 12.0 9 9 8 8 カルス数 (6) 胚切片数性 R € 3 \$ 25 8 8 はい国政 多种面 20,000 20,0000 46°C (5.9) 多用种田 46°C(5.5) 名型温度

* [表4] 表4 未熱困への熱・遠心処阻と形質転換カル スの遺核効率 (品種:朝の光) 供試菌系:LBA4404(pIC1211m),共存培養期間:5日,H m: 100mg/lハイグロマイシン

MARKET	遊心加起度	(1980年(1981年) 14 副性(1981年)	Ha 對性 0.15 操性	B/A (%)
(S)	(SOURTHAND)	3	カルス数 田	
t	.•	8		11.7
46°C (5.59)	•	8	G	15.0
1	20,0000 (1.5)	8	8	0.0
	20,0000 (100 93)	8	8	0.08
46C 5A	20,0000 (1.53)	8	25	0.98
48°C 5.99	20,0000 (100 49)	8	51	0.8

※【表5】表5 未熟胚への熱・遠心処理と形質転換カル 30 スの選抜効率 (品種:朝の光) 供試菌系:LBA4404(pIC1211m),共存培養期間:6日,H m: 100mg/ハイグロマインン

机潮道度	強いが強度	到提本知識	作式来最压 PPI 耐性 dus 最佳	B/A (%)
(処理時間)	(名類時間)	切片数 (A)	カルス数 (8)	
	•	8	=	8.0
46C (5.5))	•	z	83	52.5
	20,0008 (30 5)	8	8	66.0
46°C 5.93	20,0000 (30 分)	8	Ŧ	8

供试菌系:LBA4404(pNB131),共存培養期間:6日,PP T: 10mg//フォスフィノスライシン

[0047] 実施例2

熱・遠心の組合せ処理は、上記熱処理後、上記遠心処理 LS-inf液体培地を含む2 mlのチューブに入れた。回液体 受潰することにより行った。遠心処置は冷却遠心分離機 大きさ約1.2 mmのトウモロコシ未熱胚(品種A188. 魔林 **告地で一回洗浄した後、新たに同液体培地2.0 mlを加え** た。熱処理は46°Cのウォーターバスにチューブを3分間 により20 KG 4Cで30分間途心することにより行った。 水産省生物資源研究所より入手)を無菌的に取り出し、

S-inf液体培地に約1×10° cfu/mlの減度で、Agrobacte た後、 柏塩を除き、100m Mのアセトシリンゴンを含む1. rium tumefacions LBA4404(pSB131) (1shida et al. 19 40 を行った。対照は、室温で同時間静散した。各処則をし 96(参考文献(20))) を疑慮した液1.0 mを加え、30秒回 を含むLS-A3倍均に因床した。25°C、暗黒下で3日回柏祭 聞した後、胚軸面が倍地に接するように10 uM AcNS した後、一部の未熟胚を採取し、X-qlucによりのS遺伝 ポルテックスミキサーにより数件した。5分間室函で静

子のトランジェントな発現を調査した。なお、pSR131は スーパーパイナリーベクターである。 S

*【0051】以上の結果から、材料の未熟胚を接種前に 遠心処理あるいは熱処理することにより、従来法に比べ 形質転換効率が向上するが、両処理を組み合わせること により、さらに、高い効率で形質転換のなされることが テリウム法では形質転換できなかった4188以外のトウモ ロコン品種 (Ishida et al. 1996(参考文献(20))) につ いても熱、遠心を組み合わせて処理することにより形質

を行った。用分化した植物の葉の一部を切り取り、実施 【0048】共存培養後の未熱胚をフォスフィノスリシ 換細胞の選抜を行った。選抜培地上で増殖したカルスを た。なお、上記の培地および培養法は、Ishida, Y. et ン(PPT)及び10 mMApN,を含む倍地で培養し、形質板 Priを含む再分化焙粕に置床し、形質転換植物の再分化 例1と同様にX-qlucによりGS遺伝子の発現を調査し a)., 1996(参考文献(20))に記載の方法に従った。

明らかとなった。これらのことから、従来のアグロバク

処団した場合に強く見られた。特に組合せ処団した場合 **結果を表6に示す。無処理の対照を含め試験に供した全** その発現部位は対照に比く熱処理及び熱・遠心の組合せ を接種したときのass遺伝子のトランジェントな発現の [0049] 各処理を行った未然胚にLBA4404(pSB131) には、未熟胚の胚盤表面の広い部位でas遺伝子の発現 ての米熱胚でGK遺伝子の発現が認められた。しかし、 を示すものが殺も多く見られた。

[表6] 表6 各処理の遺伝子導入効率に及ばす影響

転換植物の得られる可能性が示唆された。

[0052]

10

れに対し、20 KC、4°C、30分間の遠心処阻を行った未然 が向上した。熱処理を行った未熱胚での形質転換効率は 質転換結果を表7に示す。 熱処理していない対照の未熟 **速心の組合せ処理を行った場合,形質転換効率は無処理** 10%で、無処理の約2倍に効容が向上した。さらに、熱・ [0050] LBA4404(pSB131)を接種した未然胚での形 胚からは、10.78の効率で形質転換植物が得られた。こ 胚では、形質転換効率は13.3%で、無処理に比べ、効率 の約3倍の29.6%であった。

(LBA4404(pSB131)を接極) 茶 う 関・ 関・ **K.R** 2 共存培養後の未熟胚でのGLS遺伝子のトランジェントな 発現の結果

[0053]

[表7] 表7 各処理の形質転換効率に及ぼす影響(LB M404(nSB131)参附入)

		*	M404(psb131)を導入)	(人 (本))
	我	PPT耐性	型種 144	GUS+
6.8	*BIRK	カルス(8)	指色(5)	新数 (v)
無処理	ĸ	9 (32.1)	9 (32.1)	3 (10.7)
6	8	18 (60.0)	15 (90.0)	6 (20.0)
340	8	14 (48.6)	9 (30.0)	4 (13.3)
素・強心	27	23 (85.2)	20 (74.1)	8 (29.8)

カルス数、植物数はいずれもクローンを含まない。

[0054] 夹貼例:

\$ クリーピングベントグラス (Agrostis palustris cv. P q/1プロリン、0.5 g/1 MES、20 g/1ショ樹、3 g/1 g 数据、NSアタミン、4 mg/l dicamba、0.5 mg/16BA、0.7 C. 暗黒下で培養した。誘導されたカルスを同組成の培 地で椎代培養し、エンブリオジェニックなカルスを増殖 C. 時黒下で板塗培袋することにより、聴倒培養細胞を 得た。 椎代後3-4日目の経濁培費細胞を1G2U倍地を含む2 Spelliteを除いた組成の液体倍増(TGL)に移し、25 elrite (pli 5.8)を含む培地 (Tの培地) に関床し、25 encross、智印種田(株))の完然種子を凝固後、NS無 した。 得られたエンブリオジェニックなカルスを1位か **同のチューブに入れた。回波体均地で一回洗浄した**

した。対照は、窒温で同時間静置した。培地を除き、10

O nMのアセトシリンゴンを包むICD-inf的地(1CD的地 トシリンゴン、4 q/1 タイブーアガロース (df5.8)を添 cfu/mlの遺貨で、Agrobacterium tumefaciens LBA4404 置した後、TG2L培地に10 g/Jグルコース、100 μMプセ 加した培地 (TCZ-AS培恤) に置床した。25°C、暗黒下で た。1週回後、回始地に20 mg/Oのハイグロマイシンを包 題、36.04 g/Jグルコースを添加(pH 5.2) に約1 × 10 ポルテックスミキサーにより攪拌した。5分間室温で静 Kiiションを含むLCI協協で価略を適先争した。回路 (pT0kQ33) (上述) を懸潤した液1.0 mlを加え、30的間 3日間培養した後、250 mg/Aのセフォタキシム及びカル む帝语に群代し、さのに1週間帝殺した後、一部の補間 他に懸濁し、25°C、暗黒下、70 rpmで回転振蟷培養し からプロリン、MES、gelriteを脱き、48.46 g/lショ を採取しx-glucによりas遺伝子の発現を調査した。

(TO 細胞でのdux遺伝子の発現を表8に示す。対照の細胞

塊がGIS遺伝子の発現を示した。また、GIS遺伝子の発現 部位も対照の首語域に比く、低・過い処理した首配域で た。これに対し、熱・遠心処理した場合、約2数の細胞 は、わずかに1細胞塊がGUSの発現を示したのみであっ はその部位は大きかった。

[0056] 今までに報告されているシバの形質転換は パーティクルガン (Zhong et al. 1993(参考文献(45)), 1., 1997(参考文献(43))) やエレクトロボーレーション (Asano Y., 1994(参考文献(3)), Asano Y. et al. 199 の効率の低さが、アグロバクテリウム法によるシバの形 8(参考文献(4))) による直接導入法によるもので、アグ 本実施例でもみられたように、従来法による遺伝子導入 **買転換を困難にしている原因であれば、高頻度で遺伝子** Hartman et al. 1994(参考文献(12)), Xiao,L. et a ロバクテリウムによる形質転換の成功例はみられない。 導入のなされる本願発明の熱、遠心の組合せ処理によ り、形質転換植物の得られる可能性が示された。

[表8] 表8 シバ壁御培養細胞への遺伝子導人効率に

及ぼす熱・遠心処理の効果

	有四名数		
10.0	桃飲	GUS+	GUS+ (N)
が、後、	65	æ	1.62
新	101	-	1.0

も存倍登後、2週間後にGUS遺伝子の免現を調査

、発明の効果】本発明により、従来のアグロバクテリウ ム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で、組織を付 植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法が提供 された。本発明の方法は、単子集植物に対しても双子薬 きなかった植物も、本発明の方法により形質転換が可能 従来のア グロバクテリウム 法では形質 転換することがで **値物に対しても適用可能である。また、シバのように、** 偽することなく簡便に遺伝子導入を行うことがむきる、 **になった**。

[0059] 麥考文献

(1) Aldomita RR, Hodges TK (1996) Agrobacterium tu (2) An, G., Evert, P.R., Mitra, A. and Ha, S.B. (1 988) Binary vectors. In Gelvin, S.B. and Schilpero ort, R.A. (eds.), Plant Molecular Biology Manual A mefacions-mediated transformation of japonica and Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 1–19. indica rice varieties. Planta 199: 612-617

of Agrostis alba obtained by electroporation-media ted direct gene transfer into protoplasts. Plant C (3) Asano, Y., Uqaki, M. (1994) Transgenic plants ell Reports 13:243-246.

【0055】LBAAOA(pTOKQ33)を按钮したシバ懸御培養

ន

液体培地を加えた後、5,000 rpm, 4℃、10分間遠心処理

スにチューブを5分間没消した。培地を除き、新たに同

役、新たに液体培恤2 mを加えた。46℃のウォーターバ

応暦2000-342253

(4) Asano, Y., Ito, Y., Fukami, M., Suqiura, K., F esping bentgrass plants obtained by electroporatio n using an altered buffer. Plant Cell Reports 17:9 ujiie, A. (1998) Herbicide-resistant transgenic cr (5) Bevan, M. (1984) Binary Agrobacterium vectors

for plant transformation. Nucleic Acids Res., 12, 8711-8721.

M., Sims, L., and Huffmarm G. (1992) Microproject ile bombardment of plant tissues increases transfo mation frequency by Agrobacterium tumefaciens. Pl (6) Bidney, D., Scelange, C., Martich, J., Burrus, ant Mol. Biol., 18, 301-313.

um tumefaciens DNA and PS8 bacteriophage DNA not d (7) Chilton, M-D., Currier, TC. Farrand, SK. Bendi ch, AJ. Gordon, MP. &Nester EW. (1974) Agrobacteri etected in crown gall tumers. Proc. Natl. Acad. Sc 1. USA, 71:3672-3676 (8) Chu, C. C., (1978) Proc. Symp. Plant Tissue Cu Ture, Science Press Peking, pp.43-50 2

(9) Ditta, G., Stanffeld, S., Corbin, D. and Helin ski, D.R. (1980) Broadhost range DNA cloning syste m for Gram-negative bacteria: Constructionof gone bank of Rhizobium meliloti. Proc. Natl. Acad. USA, 77, 7347-7351. (10) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Eic a new disarmed Ti plasmid vector for planttransfor holtz, D.A. and Flick, J.S. (1985) The SEV system: mation. Bio/technology, 3, 629-635.

(11) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., San G.R., Coldberg, S.B., Hoffmann, N.L. and Woo, S.C. (1983) Expression of bacterial genes in plant cel ders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M. L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Calluppi, Proc Nat1 Acad Sci USA, 80, 4803-4807.

palustris Huds.) by biolistic transformation.Biote E. (1994) Herbicide resistant turfqrass (Agrostis (12) Hartman, C.L., Lee, L., Day, P.R., Tumer, N. chnology 12:919-923.

 (1994) Efficient transformation of rice (Oryza sativa L.) mediated by Aqrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-LINA. The Plan (13) Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, t Journal, 6, 271-282. \$

(14) Ibekema, A., Iffrsch, P.R., Ibovkaas, P.J.J. a of the Agrobacterium tumefacters Ti-plasmid. Natur strategy based on separation of vir- and I-region nd Schilperoort, R.A.(1983) A binary plant vector

(15) Hood, E.E., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D.

特開2000-342253

bekena, A. (1993) NewAgrebacterium helper plasmid s for gene transfer to plants. Transgenic Res., 2, (16) Hood, E.E., Gelvin, S.B., Welchers, L.S. and in A281 on legumes. Plant Physiol, 83, 529-534.

erium tumefaciens A281 is encoded in a region of p Ti8o542 outside of T-DNA. J. Bacteriol., 168, 1291 (17) Hood, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T. and Ch ilton, M.-D. (1986) The hypervirulence of Agrobact

43-82

(18) Hood, E.E., Jon, G., Kayes, L., Kramer, J., F endonuclease map of pTi8o542, a potential Ti-plasm id vector for genetic engineering of plants. Bio/t raley, R.T. and Chilton, M.-D. (1984) Restriction echnology, 2, 702-709.

(19) Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., E ichholtz, D., Ropers, S. G. and Fraley, R. T. (1985) A simple and general method for transferring gene s into plants. Science 227, 1229-1231.

(20) Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Ko mari, T. and Kumashiro, T. (1996) High efficiency transformation of maize (Zea mays L.) mediated by Agrobacterium tumefaciens. Nature Biotechnol, 14, 745-750. (21) Jefferson, R.A. (1987) Assaying chimeric gene s in plants: the QUS gene fusion system. Plant Mo Biol. Rep., 5, 387–405.

8 E.W. (1987) Genes responsible for the supervirule (22) Jin, S., Komari, T., Gordon, M.P. and Nester, nce phenotype of Agrobacterium tumefaciens A281. Bacteriol., 169, 4417-4425.

(23) Komari, T. (1989) Trunsformation of callus cu tures of nine plant species mediated by Agrobacte rium. Plant Sci., 60, 223-229. (24) Komari, T. (1990a) Genetic characterization o f double-flowered tobacco plant obtained in a tran Sformation experiment. Theor. Appl. Genet., 80, 167 (25) Komari, T. (1990b) Transformation of cultured cells of Chenopodiumquinoa by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulenceregion of pliBo542. Plant Cell Reports, 9, 303-306.

86) Physical and functional map of supervirulent A (26) Komari, T., Halperin, W. and Nester, E.W. (19 probacterium tumefaciens tumor-inducing plasmid pT i8o542. J. Bacteriol., 166, 88-94. (27) Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. an d Kumashiro, T. (1996) Vectors carrying two separat

diated by Agrobacterium tumefaciens and segregatio n of transformants free from selection markers. Pl ant J, 10, 165-174. (28) Komarri, T. and Kubo, T. (1999) Nethods of Gen etic Transformation: Agrobacterium tumefaciens. In Vasil, I.K. (ed.) Molecular improvement ofcereal crops. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.

(29) Li, H.-Q., Sautter, C., Potrykus, I. and Puon ti-Kaerlas, J. (1996)Genetic transformation of cas sava (Manihot esculenta Crantz). Nature Biotechno 1., 14, 736-740.

Regeneration and transformation of sugarbeet by Aq robacterium tumefaciens. Plant Tissue Culture Manu (30) Lindsey, K., Gallois, P. and Eady, C. (1991) al B7:1-13. Kluwer Academic Publishers.

(31) McCormick, S. (1991) Transformation of tomato with Agrobacterium tumefaciens. Plant Tissue Cult ure Manual B6:1-9. Kluwer Academic Publishers.

(32) Murashiqe, T. and Skooq, F. (1962) Physiol. P lant 15:473-497. 2

aß-glucuronidase (QIS) reporter gene containing a n intron within the coding sequence. Plant Cell Ph (33) Ohta, S., Mita, S., Hattori, T., Namamura, K. (1990) Construction and expression in tobacco of vs101. 31: 805-813.

(34) Potrykus I., Marms, C. T. and Lorz, H. (1979) Callus formation fromcell culture protoplasts of corn (Zea mays L.). Theor. Appl. Genet. 54:209-21 (36) Potrykus, I., Bilanq, R., Futterer, J., Sautt er, C. and Schrott, M. (1998) Agricultural Biotecno logy, NY:Mercel Dekker Inc. pp. 119-159.

sformed plants using Ti plasmid vectors. Method fo (1988) Gene transfer in plants: Production of tran r Plant Molecular Biology, CA: Academic Press Inc. (37) Rogers, S.G., Horsch, R.B. and Fraley, R. T. pp.423-436.

Y., Kumashiro, T. and Takanami, Y. (1992) Cucumber mosaic virus-tolerant transquaric tomato plants ex pressing a satellite RNA. Theor. Appl. Genet., 83, (38) Saito, Y., Komari, T., Masuta, C., Hayashi, **\$**

(39) Toriyama, K. and Hinata, K. (1985) Plant Sci. 41:179-183

679-683.

(40) Trick, H.N. and Finer, J.J. (1997) SAAT: soni cation-assisted Agrobacterium-mediated transformat ion. Transgenic Research 6:329-336. (41) Visser, R.G.F. (1991) Regeneration and transf e T-DNAs for co-transformation of higher plants me 50 ormation of potato byAgrobacterium tumefaciens. Pl

-422-127A

ant Tissue Culture Manual 85:1-9. Kluwer Academic

*ステムを示す模式図である。

【作中の説配】

(42) Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chil ton, M.-D. and Nester, E.W. (1975) Plasmid required for virulence of Agrobacterium tumefaciens. J Bac teriol, 123, 255-264.

B. アグロバクテリウム属柏田の丁-DNAの左ボーダ RR アグロバクテリウム関値図のT-DNAの右ボーダ

特別2000-342253

3

(43) Xiao, L., Ha, S.-B. (1997) Efficient selectio nts following particle bombardment. Plant Cell rep n and regeneration ofcreeping bentgrass transforma orts 16:874-878.

SP スペクチノレイツン抵抗性適位子 HF ハイグロシイツン抵抗性遺伝子

IC イントロンGUS通信子

ဓ

NF カナマイシン抵抗性遺伝子

K 制配解採Kpnl部位

TC テトラサイクリン抵抗性遺伝子

- 配列 -(6.3)

> ns, J., Van Montaqu, M. and Schell, J. (1983) Ti p (44) Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leena lasmid vector for the introduction of DWA into pla nt cells without alteration of their normal regene ration capacity.EMBO J, 2, 2143-2150.

(45) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Stri (Agrostis palustris Huds.) from microprojectile bo mbardment of embryogenic callus. Plant Cell Report cklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turfgrass s 13:1-6.

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法に好ましく用いることができるス - パーパイナリーペクターの包であるptOK33の存象方 法を示す図である。

ーパーパイナリーベクターの例であるpM131の遺伝子地 [図2] 本発明の方法に好ましく用いることができるス 図を示す図である。

dr アグロバクテリウム国籍国法のTiプラスミドの会がr

シスミドpTiBoS42のヴィルレンス飲坂中のvirk遊伝子

S vir 徴戌原柱アグロバクテリウム属柏図のTiブラス

ミ FpTiBoS42の全vir領域

virC Agrobacterium tumefacions A281に合まれるTiブ

virG Agrobacterium tumefacions A281に含まれるTiブ

20 virB Agrobacterium tumefacions A281K含まれるTiプ

Tnos ノバリン合成酵素造伝子のターミネーター

ODS, cos シムダファーシのCOS部位

ORI, ori Gole1の複製開始点

P355 CAM 3557 Uモーター

AB、 アンパション型杆道RF H 制限研索Hindill 郵位

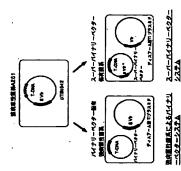
BWR bar遺伝子

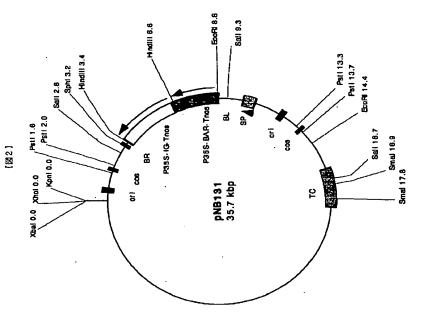
ラスミドpTiBoS42のグィルレンス領域中のAre通信子 シスミドprisps42のグィラフンメ放為中のvirca的中

> クターシステムである中国ベクターシステムとバイナリ 【図3】アグロバクテリウム属細菌の主要な2種類のベ 一ペクターシステムの構築過程を示す模式図である。

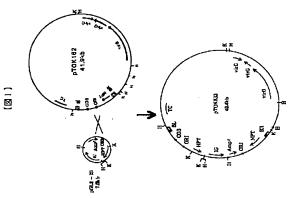
s vir TiブジスミドpTiBoS2のvir 放放の一曲を含む **原性菌株281に由来する2種類のパイナリーベクターシ*** [図4] アグロバクテリウム ツメファシエンスの遊房

[図4]





3



[图3] 野生型菌株

(16)

(72)発明者 石田 祐二 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本7c は乙産業核式会社遺伝育種研究所内

ディスアーム型商系 (タイプ2)

ディスアーム型菌系 (タイプ)

B值形成道岳子散去

所建の遺伝子 RL ASSUBLEM T-DNA

バイナリーベクターシステム

中間ペクターシステム

パイナリーベクター保有菌系

中間ベクター保有菌系

#¥OBE₹

ディスプーム型TTプラスミド

ディスプーム型 ロブラスミド

フロントページの結束

Fターム(参考) 48024 AA08 DA01 GA04 GA11 HA20